

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/FR05/000049

International filing date: 10 January 2005 (10.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0400191  
Filing date: 09 January 2004 (09.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue du Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

**INPI**  
INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE  
**JAN 2004**  
75 INPI PARIS 34 SP  
**0400191**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI

**cerfa**  
N° 11354\*03

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
**page 1/2**

**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire 08 540 0 W / 210502

<b>REMISE DES PIÈCES</b>		<b>Réservé à l'INPI</b>	
DATE			
LIEU			
N° D'ENREGISTREMENT			
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI			
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	<b>- 9 JAN. 2004</b>		
<b>Vos références pour ce dossier</b> ( <i>facultatif</i> ) CP 61.127			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2. NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i>		N°	Date
<i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	Date
		N°	Date
<b>3. TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé de production de caroténoïdes et bactéries mises en oeuvre			
<b>4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5. DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)			
		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D)	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	213, rue La Fayette	
	Code postal et ville	7514801 Paris cedex 10	
Pays	FRANCE		
Nationalité	Française		
N° de téléphone ( <i>facultatif</i> )	<input type="text"/>		
Adresse électronique ( <i>facultatif</i> )	<input type="text"/>		
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			


**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2**
**BR2**

REPRISE DES PIÈCES	
DATE <b>9 JAN 2004</b>	
LIEU <b>75 INPI PARIS 34 SP</b>	
N° D'ENREGISTREMENT	<b>0400191</b>
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Réserve à l'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>	
Nom <b>PEAUCELLE</b>	
Prénom <b>Chantal</b>	
Cabinet ou Société <b>Cabinet ARMENGaud AINE</b>	
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel <b>92-1189</b>	
Adresse	Rue <b>3, Avenue Bugeaud</b>
	Code postal et ville <b>[75]116 PARIS</b>
	Pays <b>FRANCE</b>
N° de téléphone (facultatif) <b>01-45-53-05-50</b>	
N° de télécopie (facultatif) <b>01-45-53-80-21</b>	
Adresse électronique (facultatif) <b>armengau@club-internet.fr</b>	
<b>7 INVENTEUR(S)</b> <b>Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques</b>	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> <b>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</b>	
Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <b>Uniquement pour les personnes physiques</b>	
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence). AG <input type="checkbox"/>	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> <b>Cochez la case si la description contient une liste de séquences</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
Le support électronique de données est joint	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	
Si vous avez utilisé l'imprimé ci-dessus, indiquez le nombre de pages jointes <b>1</b>	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR</b>	
DU MANDATAIRE	
DU PROPRIÉTAIRE	
DU CONCEPTEUR	

100 DE LA DÉPARTEMENT

DU 15 JANVIER



**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE**

**26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53.04.53.04**

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

1er dépôt

## **BREVET D'INVENTION**

## **CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**Code de la propriété intellectuelle - Livre VI**

N° 11354-03

## **REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1

BR/SUITE

REMISE DES PIÈCES DATE		Réserve à l'INPI	Page suite N° !.../...	
LIEU <b>9 JAN 2004</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>75 INPI PARIS 34 SP</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire 08 829 0 W / 0107		
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		CP 61.127		
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date	N°	
		Pays ou organisation Date	N°	
		Pays ou organisation Date	N°	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		Commisariat à l'Energie Atomique (C.E.A)		
Prénoms				
Forme juridique		Etablissement Public		
N° SIREN		[ ]		
Code APE-NAF		[ ]		
Domicile ou siège	Rue	31-33 rue de la Fédération		
	Code postal et ville	[7 5 1 7 5 2] PARIS cedex 15		
	Pays	FRANCE		
Nationalité		Française		
N° de téléphone (facultatif)				
N° de télécopie (facultatif)				
Adresse électronique (facultatif)				
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale				
Prénoms				
Forme juridique				
N° SIREN		[ ]		
Code APE-NAF		[ ]		
Domicile ou siège	Rue			
	Code postal et ville	[ ]		
	Pays			
Nationalité				
N° de téléphone (facultatif)				
N° de télécopie (facultatif)				
Adresse électronique (facultatif)				
<b>6 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		Mandataire: Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 9 janvier 2004	<i>[Signature]</i>	
		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>		
		<b>L. MARIELLO</b>		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**"Procédé de production de caroténoïdes  
et bactéries mises en œuvre."**

La présente invention est relative à un procédé de synthèse de caroténoïdes, en particulier, de caroténoïdes non photosynthétiques, par des bactéries photosynthétiques, en particulier, par *Rhodopseudomonas palustris* et aux bactéries mises en œuvre dans le procédé.

Plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés dans la nature. Ils sont répandus chez de très nombreux organismes vivants mais ne sont synthétisés de *novo* que par un nombre restreint d'organismes (plantes, bactéries, levures). Certains de ces caroténoïdes (lycopène,  $\beta$ -carotène, canthaxanthine, astaxanthine) sont utilisés de façon intensive et très diverse dans l'industrie agro-alimentaire pour leur propriété colorante (rouge pour le lycopène, jaune pour le  $\beta$ -carotène, orange pour la canthaxanthine, rose-orange pour l'astaxanthine). On retrouve en particulier l'utilisation de l'astaxanthine et de la canthaxanthine en aquaculture pour l'élevage des saumons et des truites afin de renforcer la couleur rose-orange de la chair du poisson et en aviculture pour accentuer la couleur jaune-orange des œufs qui, dans les 2 cas, est appréciée par les consommateurs.

De plus, de par leurs propriétés antioxydantes et leur rôle de photo protection, ils sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique pour l'obtention entre autre de crème solaire protectrice et de produits bronzants. Il existe déjà dans certains pays toute une série de produits dérivés de la canthaxanthine, du  $\beta$ -carotène et du lycopène, commercialisés dans les instituts de beauté et de body-building. Ces caroténoïdes ont également été décrits comme possédant des propriétés anti-tumoreuses. Ainsi, une grande partie des caroténoïdes peuvent être utilisés dans diverses applications industrielles et médicales.

La synthèse actuelle de ces caroténoïdes est principalement réalisée par voie chimique. Etant donné la tendance du consommateur à préférer les produits ayant une origine naturelle, il existe donc un marché potentiel pour des 5 caroténoïdes de provenance végétale ou microbienne. De plus, il apparaît que les configurations isomériques de certains caroténoïdes produits par voie chimique ne correspondent pas aux principaux isomères retrouvés dans la nature. Cette différence peut s'avérer très importante car elle est 10 susceptible d'entraîner une bio-assimilation supérieure des caroténoïdes d'origine naturelle par rapport à ceux issus de la synthèse chimique.

La voie de biosynthèse de ces 4 principaux caroténoïdes (lycopène,  $\beta$ -carotène, astaxanthine, canthaxanthine) est 15 présentée dans la figure 1. Le lycopène synthétisé grâce à l'action successive des enzymes CrtE, CrtB et CrtI est un intermédiaire commun aux 3 autres caroténoïdes. La synthèse du  $\beta$ -carotène peut être ainsi réalisée à partir du lycopène grâce à l'enzyme CrtY, celle de la canthaxanthine grâce aux enzymes 20 CrtY et CrtW et celle de l'astaxanthine grâce aux enzymes CrtY, CrtW et CrtZ .

Plusieurs bactéries ont été décrites pour leur capacité à produire l'un de ces 4 caroténoïdes (*Brevibacterium*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Erwinia uredovora*, *Erwinia herbicola*, *Myxococcus xanthus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bradyrhizobium* ...).

En particulier, des travaux antérieurs des inventeurs, qui ont fait l'objet d'un dépôt aux Etats-Unis sous le numéro US 60/297,247, ont porté sur la souche *Bradyrhizobium* ORS278. Ces 30 travaux ont démontré l'existence d'un cluster de gènes (crtE, crtY, crtI, crtB, crtW) intervenant dans la voie de biosynthèse de la canthaxanthine. Ces différents gènes, une fois introduit chez *E. coli*, se sont avérés fonctionnel.

À l'exception de *Bradyrhizobium*, qui synthétise une faible quantité de photosystème, ces bactéries sont généralement des bactéries non-photosynthétiques qui accumulent de faibles quantités de produits et qui ont bien souvent un taux de croissance limité. La nature de la souche productrice constitue donc un obstacle majeur pour assurer une productivité suffisamment intéressante pour un industriel.

Par ailleurs, ces bactéries ne produisent en général qu'un seul de ces 4 caroténoïdes. Ceci implique pour un industriel voulant produire un panel de ces 4 principaux caroténoïdes d'utiliser différentes souches bactériennes qui vont chacune exiger des conditions bien particulières de culture et de production. D'autre part, la culture de différentes souches sur un même site peut entraîner de nombreuses difficultés logistiques liées aux problèmes de contamination.

Enfin, les caroténoïdes sont des composés hydrophobes qui ne peuvent être stockés dans la cellule que dans un environnement lipophile, généralement des compartiments membranaires. Les bactéries produisant des caroténoïdes d'intérêt industriel possèdent en général une membrane interne faiblement développée. Cette propriété, qui limite donc la quantité de caroténoïdes que l'on peut accumuler dans ces cellules, constitue l'un des problèmes majeurs pour une utilisation industrielle de ces bactéries.

Les travaux des inventeurs les ont donc amenés à rechercher une bactérie pouvant synthétiser suivant les conditions de cultures et/ou suivant les gènes caroténoïdes introduits dans celle-ci, l'ensemble de ces 4 principaux caroténoïdes et ceci en palliant les défauts des autres bactéries.

Les bactéries photosynthétiques présentent des avantages importants : une vitesse de croissance très rapide et une très grande efficacité énergétique. Ces bactéries sont capables de produire des caroténoïdes dans des conditions de culture très simples et peuvent être utilisées pour la production de caroténoïdes.

jouent un rôle essentiel dans son fonctionnement. La forte activité photosynthétique est accompagnée de la synthèse en grande quantité de caroténoïdes photosynthétiques associée à la mise en place de membranes intracytoplasmiques en abondance 5 constituant une zone de stockage importante pour les caroténoïdes.

Néanmoins, ces bactéries ne synthétisent en général qu'un seul pigment, la spirilloxanthine ou le sphéroïdène, qui ne présentent pas, à l'heure actuelle, d'intérêt industriel.

10 Afin d'obtenir un microorganisme producteur de lycopène,  $\beta$ -carotène, canthaxanthine ou astaxanthine, les inventeurs ont exploité le potentiel que présentent les bactéries photosynthétiques en détournant la voie de synthèse endogène du caroténoïde photosynthétique vers la synthèse de 15 caroténoïdes non photosynthétiques c'est à dire non associé au photosystème, chez ces bactéries:  $\beta$ -carotène, canthaxanthine ou astaxanthine.

La présente invention est donc relative à un procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques choisis parmi 20 le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 25 i. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- ii. Insertion des gènes suivants :
- 30 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

iii. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées, et,

iv. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.

De manière surprenante, il a été constaté qu'une bactérie synthétisant un caroténoïde photosynthétique (c'est-à-dire impliqué dans la photosynthèse) restait photosynthétique lorsque la voie de synthèse endogène dudit caroténoïde était détourné vers la synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques.

En effet, la bactérie continue de synthétiser de manière résiduelle du lycopène, caroténoïde photosynthétique, qui permet à celle-ci de maintenir son activité de photosynthèse en remplaçant dans le photosystème le caroténoïde photosynthétique synthétisé de manière endogène.

Les gènes à déléter au moins partiellement sont en général, les crtC, crtD et/ou crtF. De préférence, les gènes crtC et crtD seront au moins partiellement déletés. Ces gènes sont en effet les premiers à être mis en œuvre dans la synthèse de la spirilloxanthine à partir du lycopène. (voir figure 1)

En outre, il peut également être nécessaire de déléter dans certaines bactéries le crtA. Ce sera le cas pour les bactéries synthétisant du lycopène-2-one. (voir figure 1)

De préférence, les bactéries photosynthétiques sont les suivantes : *Rubrivivax gelatinosus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum moliscianum*, *Rhodospirillum salinarum*, *Rhodospirillum mediosalinum*, *Rhodospirillum sodomense*, 30 *Rhodocista centenaria*, *Rhodospira trueperi*, *Rhodopseudomonas malustris*, *Rhodopseudomonas acidophila*, *Rhodopseudomonas* *lutea*, *Rhodopseudomonas erythraea*, *Rhodopseudomonas* *marina*, *Rhodopseudomonas* *sp.*

Plus particulièrement, le procédé selon l'invention propose des conditions de culture assurant une production à un niveau satisfaisant de ces différents caroténoïdes. En particulier, il s'agit d'un procédé de synthèse de canthaxanthine ou d'astaxanthine, caractérisé en ce que les conditions de la mise en culture des bactéries sont séquentielles et comportent les étapes suivantes :

- a. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées dans un premier temps en anaérobiose sous éclairement,
- 10 b. Puis, dans un second temps en aérobiose ou en microaérobiose, à l'obscurité.

En effet, chez les bactéries photosynthétiques, les gènes photosynthétiques, incluant les gènes *crtE*, *crtB*, et *crtI* de la voie de biosynthèse du lycopène sont sous le contrôle de l'oxygène et de la lumière. En particulier, chez certaines souches ces gènes ne s'expriment pas à l'obscurité et sont inhibés par la présence d'oxygène (> à 8%). Cette répression par l'oxygène résulte d'un facteur de transcription appelé *PpsR* qui à forte pression partielle en oxygène se fixe sur les régions promotrices des gènes photosynthétiques, dont les gènes *crt*, empêchant ainsi leur transcription.

En revanche, l'absence de dioxygène est défavorable à la production de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine. En effet, la réaction enzymatique catalysée par les enzymes *CrtW* ( $\beta$ -carotene kétolase) ou *CrtZ* ( $\beta$ -carotène hydroxylase) intervenant dans la voie de biosynthèse de ces 2 caroténoïdes nécessite de l'oxygène (voir Figure 1). Il est donc nécessaire pour permettre la synthèse de canthaxanthine et d'astaxanthine de trouver un compromis au niveau des conditions de culture afin d'assurer d'une part la synthèse de l'intermédiaire lycopène et d'autre part sa transformation en canthaxanthine ou en astaxanthine.

Avantageusement, les étapes a et b des conditions de culture permettant d'obtenir préférentiellement de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine sont réitérées successivement. Une telle itération permet l'accumulation des 5 caroténoïdes dans les cellules.

Alternativement, le procédé selon l'invention permet la production de  $\beta$ -carotène si l'on modifie les conditions de culture. Ces conditions photosynthétiques de mise en culture sont alors les suivantes :

- 10 a. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en anaérobiose sous éclairement.

En effet, le fonctionnement de l'enzyme CrtY (lycopène cyclase) qui permet la transformation de lycopène en  $\beta$ -carotène n'étant pas oxygène-dépendante, l'absence de l'étape 15 b des conditions de culture pour la canthaxanthine ou l'astaxanthine permet d'arrêter la synthèse au stade du  $\beta$ -carotène.

Une seule bactérie permet donc de synthétiser à la fois du lycopène et préférentiellement, soit du  $\beta$ -carotène, soit de la 20 canthaxanthine ou de l'astaxanthine selon les gènes introduits et les conditions de culture.

Alternativement, les conditions de culture permettant d'obtenir préférentiellement de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine peuvent être réalisées en conditions de 25 microaérobiose sous éclairement en une seule étape.

En condition de microaérobiose, le pourcentage de dioxygène est de préférence compris entre 1 et 10%, plus particulièrement, 3 à 8%, bornes incluses.

Afin de s'affranchir des limitations dues à la régulation 30 de la synthèse par le dioxygène, l'invention propose également un procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques

photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce que le procédé comporte les étapes suivantes :

- i. Mise en œuvre de mutants de bactéries photosynthétiques  
5 dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène,
- ii. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière  
10 à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- iii. Insertion des gènes suivants :
  - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β-carotène,
  - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à  
15 synthétiser est la canthaxanthine ou le β-carotène,
  - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β-carotène,
- iv. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en aérobiose ou microaérobiose afin de synthétiser de la  
20 canthaxanthine ou de l'astaxanthine ou mise en culture en condition d'anaérobiose afin de synthétiser du β-carotène, et,
- v. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.

25 Les mutants dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène sont obtenus en particulier par délétion du gène codant pour le facteur de transcription PpsR, ledit facteur réprimant l'expression de certains gènes crt à forte pression partielle en dioxygène.

30 Avantageusement, les bactéries mises en œuvre dans le procédé sont du genre *Rhodopseudomonas*, de préférence de l'espèce, *Rhodopseudomonas palustris*.

Certaines bactéries ne synthétisent pas de lycopène, mais un intermédiaire plus en amont dans la voie de synthèse des

caroténoïdes. Il est alors possible de modifier ces bactéries de manière à les faire synthétiser du lycopène.

Les bactéries photosynthétiques du procédé selon l'invention sont alors obtenues à partir de bactéries 5 photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un 10 gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

Les bactéries sont préférentiellement : *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter veldkampii*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter azotoformans*, *Rhodobacter blasticus*, *Rhodovulum sulfidophilum*, *Rhodovulum adriaticum*, *Rhodovulum euryhalinum*, *Rhodovulum strictum* ...

Dans une telle hypothèse, les gènes à déléter sont identiques à ceux cités précédemment. En effet, les dérivés du sphéroïdène sont obtenus à partir du neurosporène (le crtI 20 endogène code pour une phytoène désaturase assurant seulement 3 étapes successives de désaturation du phytoène). Les gènes codant pour les premières enzymes mises en œuvre par la suite sont le crtC, le crtD et/ou le CrtF. (voir figure 1)

En outre, il peut également être nécessaire de déléter 25 dans certaines bactéries le crtA. Ce sera le cas pour les bactéries synthétisant du  $\zeta$ -carotène-2-one ou du neurosporène-2-one. (voir figure 1)

De manière avantageuse, l'insertion des gènes crtY, crtZ et/ou crtW du procédé selon l'invention est réalisée dans la 30 zone des gènes au moins partiellement déletés.

Alternativement, les gènes crtY, crtZ et/ou crtW peuvent également être insérés dans un classeur.

concomitante, au moins du lycopène, du  $\beta$ -carotène et de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine, caractérisées en ce que lesdites bactéries sont susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'invention.

5 En particulier, ces bactéries photosynthétiques synthétisant au moins un caroténoïde dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, sont caractérisées en ce qu'elles comportent les mutations suivantes :

10 i. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

15 ii. Insertion des gènes suivants :

- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène.

20 Alternativement, il s'agit d'un mutant de bactéries photosynthétiques synthétisant au moins un caroténoïde dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, dont la synthèse du photosystème n'est plus réprimée par le dioxygène, produisant de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine,

25 caractérisé en ce qu'il comporte les mutations suivantes:

- i. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- 30 ii. Insertion des gènes suivants :
  - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène.

5 Ces bactéries ou mutants peuvent être obtenus à partir de bactéries ou de mutants produisant au moins un caroténoïde dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le 10 phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ou mutants ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

15 De manière surprenante, il a été constaté que ces bactéries ou mutants de bactéries photosynthétiques, bien qu'ayant leur voie de synthèse du caroténoïde photosynthétique endogène détournée vers la synthèse d'un caroténoïde non photosynthétique d'intérêt ont leur activité photosynthétique 20 maintenue.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples avec références aux figures suivantes :

- la figure 1 représente le schéma de synthèse des 25 différents caroténoïdes visés par l'invention,
- la figure 2 présente le schéma de synthèse de la stratégie de construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC :: crtY ::crtW ::alpha3
- la figure 3 présente le schéma de synthèse de la 30 stratégie de construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC ::crtY ::crtZ ::crtW ::alpha3, etc.

1 - Le document est une copie de l'original que je déclare être exacte et complète en toutes ses parties.

CEA001ΔcrtDC ::crtY ::crtW sous différentes conditions de culture.

Exemple 1 : construction d'une souche mutante de

5 Rhodopseudomonas palustris produisant du lycopène

La séquence du cluster de gènes crt de *R. palustris* impliqué dans la synthèse de la spirilloxanthine est accessible sur Internet à l'adresse suivante <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Acc Number : BX572597).

10 Comme dans *Bradyrhizobium* ORS278, les gènes crtE, crtI, crtB, crtC, crtD, crtF sont présents et organisés en 3 opérons

La stratégie générale de construction de cette souche mutante va consister à disrupter les gènes crtD et crtC en y 15 insérant une cassette codant un gène de résistance à la kanamycine (gène apha3).

**1<sup>ère</sup> étape : isolement et clonage des gènes crtDC de R. palustris :**

20 Une région correspondant à une partie des gènes crtDC de *R. palustris* a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces :

crtD.R.palu.XhoI.f : GAGCTCGAGTCGCCGGCATCGGCCTGAACTTCTC  
(SEQ ID N°1)

CrtC.R.palu.XhoI.r : CTGCTCGAGAGGAGTATTACGGACTGATCGAAC  
25 (SEQ ID N°2)

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de restriction XhoI de part et d'autre du produit de PCR.

Les amplifications sont réalisées avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx 30 DNA Polymerase).

Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s puis 55°C pendant 30s puis 68°C pendant 3 min), suivis d'une étape

finale d'elongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle 5  $\mu$ l de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape 10 est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T utilisé ultérieurement).

Le produit de PCR ainsi obtenu est cloné dans le vecteur de clonage pGEM-T (commercialisé par la société Promega®) suivant le protocole du fournisseur. Le plasmide obtenu est 15 nommé pGEM-T/crtDC.XhoI).

#### **2<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC**

La région correspondant aux gènes crtDC de *R. palustris* est libérée par digestion XhoI du plasmide pGEM-T/crtDC.XhoI 15 puis ligaturée dans le vecteur suicide pJQ200mp18 linéarisé par digestion SalI. Ce plasmide contient le gène suicide sacB qui permet de sélectionner sur saccharose les clones pour lesquels un événement de double « crossing over » a bien eu lieu (Quandt, J. & Hynes, M. F. « Versatile suicide vectors 20 which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria » ; Gene 127, 15-21, 1993).

#### **3<sup>ième</sup> étape: Construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC: : apha-3**

25 Le gène apha-3 codant une résistance à la kanamycine est libéré du plasmide pUC4K commercialisé par la société Amersham® par digestion avec l'enzyme SalI. Il est alors inséré dans le plasmide pJQ200mp18/crtDC linéarisé par SalI. Il est à noter que cette dernière digestion SalI entraîne une 30 délétion d'un fragment de 618pb correspondant à l'extrémité 5' du gène crtDC et l'extrémité 3' du gène crtDC.

Le plasmide résultant (pJQ200mp18/crtDC: : apha-3) est transféré dans *R. palustris* K131 et transformé par introduction d'un vecteur contenant le gène apha-3.

4ième étape : Construction d'une souche mutante de *R. palustris* contenant la cassette apha3 au niveau des gènes *crtD, crtC*.

5 Le plasmide précédent pJQ200mp18 /*crtDC*: : *aphA-3* est délivré dans la souche sauvage de *R. palustris* (CEA001) par conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1 contenant la construction. Les clones conjuguants sont sélectionnés sur milieu Hutner (R. K. Clayton « Towards the isolation of a  
10 photochemical reation center in Rhodopseudomonas sphaeroides » ; Biochim. Biophys. Acta 75 : 312-318, 1963) contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbenicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjuguant sur milieu Hutner  
15 contenant du saccharose 5% et de la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que l'insertion de la cassette apha3 au niveau des gènes *crtD* et *crtC* de *R. palustris*.

La production de lycopène en grande quantité a été  
20 constatée chez les bactéries ainsi mutées. Par ailleurs, le caractère photosynthétique de la bactérie est conservé.

Exemple 2 : Construction d'une souche mutante de Rhodopseudomonas palustris produisant du B-carotène ou de la canthaxanthine

#### Schéma de construction

La stratégie de construction de cette souche mutante est résumée dans la figure 2.

Dans cette figure, les légendes des étapes sont les  
30 suivantes :

1<sup>ère</sup> étape : Amplification des gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278, ainsi que des gènes *crtDC* de *R. palustris*. Clonage des produits de PCR dans le plasmide p-GEMT (Promega).

2<sup>ième</sup> étape : Libération par *Sall* de la cassette *apha3* du plasmide *puc4K* commercialisé par Amersham. Insertion au niveau du site *XhoI* unique présent en aval de *crtW*.

3<sup>ième</sup> étape : Libération des gènes *crtW* et *apha3* par 5 *KpnI/EcoRI*. Insertion dans le plasmide *pGEM-T/crtY* linéarisé par les mêmes enzymes.

4<sup>ième</sup> étape : Libération des gènes *crtY*, *crtW* et *apha3* par *BglIII/EcoRI*. Insertion dans le plasmide *pGEM-T/crtDC* linéarisé par les mêmes enzymes.

10 5<sup>ième</sup> étape : Libération des gènes *crtDC*, *crtY*, *crtW* et *apha3* par *XbaI*. Insertion dans le plasmide *pJQ200mp18* linéarisé par la même enzyme

#### A. Stratégie de Construction

15 La stratégie globale pour construire une souche mutante de *R. palustris* produisant soit du β-carotène soit de la canthaxanthine a consisté à disrupter les gènes *crtD*, *crtC* de *R. palustris* en y insérant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium ORS278* ainsi qu'un gène *aphA-3* codant pour une 20 résistance à la kanamycine.

Suivant les conditions d'oxygénation de la culture (voir exemple 3) l'enzyme *CrtW* transformant le β-carotène en canthaxanthine est fonctionnelle ou pas, ce qui conduit au choix à une accumulation de β-carotène ou de canthaxanthine.

25

1<sup>ère</sup> étape : isolement et clonage des gènes *crtDC* de *R. palustris*, *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium ORS278* :

Une région correspondant à une partie des gènes *crtDC* de *R. palustris* a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces :

30 *crtD.R.palu.XbaI.f* : GAGTCTAGATTCCGCCGGCATCGGCCTGAACCTTC  
(SEQ ID N°3)

*crtD.R.palu.XbaI.r* : .TTCTTAATGGGAGATTCCTGATGTTTGAA

Les amores ont été conçues de façon à insérer un site de restriction *XbaI* de part et d'autre du produit de PCR.

Le gène *crtY* de *Bradyrhizobium* ORS278 a été amplifié à l'aide du couple d'amores suivant:

5        *crtY.278.f* :

TGAGATCTGGAGGCTGTCGTACATGAGTCGAGATGCCGACGTCATCGTC (SEQ ID N°5)

*crtY.278.r* : GTTGAATTCCCTGGTACCTCATGGGGTCTTGAAGGCGCTCGCCTCA  
(SEQ ID N°6)

Les amores ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS et un site de restriction *BglII* en 5' 10 ainsi qu'un site de restriction *KpnI* et *EcoRI* en 3' du produit de PCR.

Le gène *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 a été amplifié à l'aide du couple d'amores suivant :

15        *crtW.ORS278.f* :

CGGTACCGGGAGCTTGCCAATGCATGCAGCAACCGCCAAGGCTAC (SEQ ID N°7)

*crtW.ORS278.r* : GTGAATTCCATGCTCGAGCGGGTTAGTCACGCCTTCCAG  
(SEQ ID N°8)

Les amores ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS et un site de restriction *Kpn I* en 5' 20 ainsi qu'un site de restriction *Xho I* et *EcoR I* en 3' du produit de PCR.

Les amplifications sont réalisées avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum *Pfx* 25 DNA Polymerase).

Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s puis 30 55°C pendant 30s puis 68°C pendant 3 min), suivi d'une étape finale d'elongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle 1μl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape

est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T utilisé ultérieurement).

Les 3 produits de PCR ainsi obtenus sont clonés dans le vecteur de clonage pGEM-T (commercialisé par la société Promega®) suivant le protocole du fournisseur. Les plasmides obtenus sont nommés pGEM-T/crtDC.XbaI ; pGEM-T/crtY ; pGEM-T/crtW

10 3      **2<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/crtW : :aphA-**

Le gène *aphA-3* codant une résistance à la kanamycine est libéré du plasmide pUC4K commercialisé par la société Amersham par digestion avec l'enzyme *SalI*. Il est alors inséré dans le plasmide pGEM-T/crtW linéarisé par *XhoI*.

15      **15 3      3<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/crtY : :crtW : : aphA-3**

La construction précédente contenant les gènes *crtW* et *aphA-3* est libérée par double digestion *KpnI/EcoRI* puis insérée dans le plasmide pGEM-T/crtY linéarisé par le même couple d'enzymes de restriction.

20      **4<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/crtDC : :crtY : : crtW : : aphA-3**

25      La construction précédente contenant les gènes *crtY*, *crtW* et *aphA-3* est libérée par double digestion *BglII/EcoRI* puis insérée dans le plasmide pGEM-T/crtDC linéarisé par le même couple d'enzyme de restriction. La digestion de pGEM-T/crtDC par *BglII/EcoRI* entraîne une délétion d'un fragment de 30 1232 pb correspondant à une partie importante des gènes *crtD* et *crtC*.

5<sup>ème</sup> étape : Construction du plasmide pJQ200mp18 /crtDC : :crtY : :crtW : :aphA-3

La construction précédente contenant les gènes crtDC, crtY, crtW et aphA-3 est libérée par digestion XbaI puis insérée dans le plasmide suicide pJQ200mp18 linéarisé par XbaI. Le plasmide pJQ200mp18 /crtDC : :crtY : :crtZ ::crtW : :aphA-3 est enfin transféré par électroporation dans la souche conjugative *Escherichia coli* S17.1.

10 6<sup>ème</sup> étape : Construction d'une souche mutante de *R. palustris* contenant les gènes crtY et crtW de *Bradyrhizobium* ORS278.

Le plasmide précédent pJQ200mp18 /crtDC: :crtY : :crtW : :aphA-3 est délivré dans la souche de *R. palustris* CEA001 par 15 conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1 contenant la construction. Les clones conjuguants sont sélectionnés sur milieu Hutner contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbénicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjuguant sur milieu 20 Hutner contenant du saccharose 5% et de la kanamyciné (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que les gènes crtY, et crtW ont bien été insérés au niveau des gènes crtD et crtC. Un mutant est retenu pour la suite des expériences : *R. palustris* CEA001ΔcrtDC ::crtY ::crtW ,

**B. Analyse des caroténoïdes produit par la souche mutante  
*R. palustris* CEA001ΔcrtDC ::crtY ::crtW - essai dans différentes conditions de culture**

30 Afin de déterminer le potentiel de la souche mutante de *R. palustris* CEA001ΔcrtDC ::crtY ::crtW à surproduire du β-carotène et de la canthaxanthine, une série d'essais préliminaires a été réalisée dans laquelle différentes conditions de culture ont été testées.

A : Flacon de 120 ml contenant 100 ml de milieu Hutner, 30°C - dégazé pour éliminer toute trace d'oxygène, et placé sous une lampe à incandescence de 100 Watts (conditions lumière, anaérobiose)

5 B : Flacon de 250 ml rempli de 50 ml de milieu Hutner, 30°C - agitation 170 RPM - placé dans une atmosphère où la teneur en oxygène peut être ajustée à 1, 5, 8 % (Conditions lumière, microaérobiose) ou 21% (Conditions lumière, aérobiose)

10 C : Après culture en anaérobiose pendant 2 jours suivant les conditions A, 50 ml sont transférés dans un erlenmeyer à baffles puis mis à agiter 170rpm à l'obscurité pendant une nuit pour fortement oxygéner la culture.

Après 3 jours de culture dans les différentes conditions 15 testées, les caroténoïdes produits sont analysés par HPLC. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 suivant.

**Tableau 1 : production de caroténoïdes selon les conditions de culture chez le mutant *R. palustris***

20 CEA001ΔcrtDC ::crY ::crtW

Conditions	DO650	Lycopène mg/L	B-carotène mg/L	Canthaxanthine mg/L
A	3,7	2,7	4,7	0
B 1% O <sub>2</sub>	2,9	0,85	1,13	0,1
B 5% O <sub>2</sub>	2	0,35	0,19	0,32
B 8% O <sub>2</sub>	2,4	0,46	0,16	0,41
B 21% O <sub>2</sub>	1,8	0,12	0,05	0,07
C	3,7	2,4	3,8	0,8

Il apparaît clairement que les conditions d'aération et de lumière ont des effets très importants sur la production des caroténoïdes et la composition de la souche. Les figures suivantes illustrent comment cette culture peut être optimisée.

concentrations de caroténoïdes (lycopène et  $\beta$ -carotène) sont obtenues lorsque la bactérie est cultivée en condition aérobie (21%) en raison de la répression de la synthèse de l'appareil photosynthétique par l'oxygène. La présence d'importantes quantités de  $\beta$ -carotène en conditions lumière, anaérobiose montre bien que le gène *crtY* d'*ORS278* qui permet la transformation du lycopène en  $\beta$ -carotène est parfaitement fonctionnel. Par contre, on observe l'absence de production de canthaxanthine dans ces mêmes conditions. Ceci résulte du fait que l'enzyme *CrtW* qui permet la transformation du  $\beta$ -carotène en canthaxanthine est une oxygénase qui a donc besoin d'oxygène pour fonctionner. En accord avec cette explication, la concentration de canthaxanthine augmente progressivement (de 0,32 à 0,41 mg/l) lorsque la teneur en oxygène passe de 5 à 8% avec une baisse concomitante de  $\beta$ -carotène (tableau I). Cette expérience démontre, d'une part la nécessité de la présence d'oxygène pour la formation de canthaxanthine à partir de  $\beta$ -carotène, d'autre part que l'enzyme *CrtW* d'*ORS278* est également fonctionnelle chez ce mutant. La transformation de  $\beta$ -carotène en canthaxanthine en fonction de la teneur en oxygène est aussi démontrée par le chromatogramme présenté sur la figure 4. Un autre argument en faveur d'une transformation du  $\beta$ -carotène en canthaxanthine de façon équimolaire en présence d'oxygène est présenté dans les conditions C, c'est-à-dire en oxygénant la culture après croissance en anaérobiose, où il est possible de transformer une partie de ce  $\beta$ -carotène en canthaxanthine.

Ces premiers essais montrent bien qu'il est possible de produire de la canthaxanthine chez *R. palustris*. Par ailleurs, en jouant sur les conditions d'aération, la quantité de  $\beta$ -carotène transformable en canthaxanthine devrait être proche de 5mg/l soit 6 fois plus que la quantité de canthaxanthine (0,8mg/l) obtenue en culture liquide avec la souche *Bradyrhizobium* *ORS278*. De plus, le temps de culture a été

divisé par un facteur supérieur à 2 soit une augmentation du même rapport de la productivité.

**Exemple 3 : Stratégie de construction d'une souche mutante**  
**5    de *Rhodopseudomonas palustris* produisant de l'astaxanthine**

**Schéma de construction**

La stratégie de construction de cette souche mutante est résumée en figure 3.

Dans cette figure, les légendes des étapes sont les  
**10 suivantes :**

**1<sup>ère</sup> étape :** Amplification du gène *crtZ* de *Pseudomonas putida*. Clonage du produit de PCR dans le plasmide p-GEMT (Promega).

**2<sup>ième</sup> étape :** Libération par *KpnI* du gène *crtZ*. Insertion  
**15** dans le site *KpnI* unique du plasmide pGEM-T/*crtY::crtW::apha3*.

**3<sup>ième</sup> étape :** Libération des gènes *crtY*, *crtZ*, *crtW* et  
*apha3* par *BglII/EcoRI*. Insertion dans le plasmide pGEM-T/*crtDC* linéarisé par les mêmes enzymes.

**4<sup>ième</sup> étape :** Libération des gènes *crtDC*, *crtY*, *crtZ*, *crtW*  
**20** et *apha3* par *XbaI*. Insertion dans le plasmide pJQ200mp18 linéarisé par la même enzyme

**Construction**

La stratégie générale consiste à insérer le gène *crtZ* de  
**25** *Pseudomonas putida* dans la souche mutante précédemment construite de *R. palustris* contenant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278. L'insertion est faite au niveau du site unique de restriction *KpnI* présent entre les gènes *crtY* et *crtW*.

**30**

**1<sup>er</sup> étape :** Construction du plasmide pGEM-T/*crtZ*

Le génome de *Rhodopseudomonas palustris* a déjà été clairement analysé. Les gènes *crtY* et *crtW* sont situés sur deux chromosomes distincts.

amplifié à partir de l'ADN génomique de *Pseudomonas putida* à l'aide du couple d'amorces :

crtZ.Ps.putida.f :

CCTTTGGTACCGGAGGACCGTTCCATGCTGTTCAATCTGCCATATT (SEQ ID N°9)

5 crtZ.Ps.putida.r : GGGGTACCTCACGATTGGCTGCGCCTGCTGCGCAATTG  
(SEQ ID N°10)

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS en 5' et un site de restriction *Kpn I* en 5' et en 3' du produit de PCR.

10 L'amplification est réalisée avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx DNA Polymerase).

Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5  
15 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s, puis 55°C pendant 30s, puis 68°C pendant 1 min), suivi d'une étape finale d'elongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle 1μl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine  
20 aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T utilisé ultérieurement).

Le produit de PCR ainsi obtenu est cloné dans le vecteur de clonage pGEM-T suivant le protocole du fournisseur. Le  
25 plasmide obtenu est nommé pGEM-T/crtZ.

2<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/crtDC :: crtY :: crtZ :: crtW :: aphA-3

La construction précédemment obtenue pGEM-T/crtDC :: crtY :: crtZ :: crtW :: aphA-3 contenant les gènes crtW, crtY de *Bradyrhizobium ORS278* et le gène de résistance à la kanamycine aphA-3 inséré dans les gènes crtDC de *R. palustris* est linéarisée par l'enzyme *KpnI* dont le site de restriction est situé entre les gènes crtW et crtY. Le gène crtZ cloné

dans le vecteur pGEM-T/crtZ est libéré par *KpnI*, puis inséré par ligation dans la construction précédente linéarisée.

3ième étape : Construction du plasmide pJQ200mp18  
5 /crtDC : :crtY : :crtZ ::crtW : :aphA-3

La construction précédente contenant les gènes crtDC, crtY, crtZ, crtW et aphA-3 est libérée par digestion *XbaI* puis insérée par ligation dans le plasmide suicide pJQ200 mp18 linéarisé par *XbaI*. Le plasmide pJQ200mp18  
10 /crtDC : :crtY : :crtZ ::crtW : :aphA-3 est transféré par électroporation dans la souche conjugative *Escherichia coli S17.1*.

4ième étape : Construction d'une souche mutante de *R. palustris* CEA001 contenant les gènes crtY et crtW de *Bradyrhizobium ORS278* et crtZ de *Pseudomonas putida*.

Le plasmide précédent pJQ200mp18 /crtDC : :crtY : :crtZ : :crtW : :aphA-3 est délivré dans la souche *R. palustris* CEA001 par conjugaison avec la souche précédente *E. coli S17.1* 20 contenant la construction. Les clones conjuguants sont sélectionnés sur milieu Hutner contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbénicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjuguants sur milieu Hutner contenant du saccharose 5% et de 25 la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que les gènes crtY, crtZ et crtW ont bien été insérés au niveau des gènes crtD et crtC.

En condition de culture en microaérobiose (8% d'oxygène), 30 la production d'estaxanthine en grande quantité a été constatée chez les bactéries ainsi mutées.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques choisis parmi le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde 5 photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- i. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la 10 voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- ii. Insertion des gènes suivants :
- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser 15 est le  $\beta$ -carotène,
  - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
  - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou 20 le  $\beta$ -carotène,
- iii. Mise en culture des bactéries ainsi modifiées, et,
- iv. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) 25 dans les bactéries.

2. Procédé selon la revendication 1, de synthèse de canthaxanthine ou d'astaxanthine, caractérisé en ce que les conditions de mise en culture sont séquentielles et comportent les étapes suivantes :

- 30 c. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées dans un premier temps en anaérobiose sous éclairement,

d. Puis, dans un second temps en aérobiose en obscurité.

3. Procédé selon la revendication 1 de synthèse de  $\beta$ -carotène, caractérisé en ce que les conditions de mise en culture sont les suivantes :

b. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en anaérobiose sous éclairement.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les étapes a et/ou b sont réalisées en conditions de microaérobiose sous éclairement.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'en conditions de microaérobiose, le pourcentage de dioxygène est compris entre 1 et 10%, de préférence, 3 à 8%, bornes incluses.

15 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que l'on réitère les étapes a et b successivement.

7. Procédé de synthèse de caroténoïdes choisis parmi le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine, mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce que le procédé comporte les étapes suivantes :

25 i. Mise en œuvre de mutants de bactéries photosynthétiques dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène,

ii. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène.

iii. Inactivation des gènes adjacents.

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
  - 5 - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
  - iv. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en aérobiose ou microaérobiose afin de synthétiser de la canthaxanthine ou de 10 l'astaxanthine ou mise en culture en condition d'anaérobiose afin de synthétiser du  $\beta$ -carotène, et,
  - v. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.
- 15 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les mutants dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène sont obtenus par délétion du gène codant pour le facteur de transcription PpsR.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 20 précédentes, caractérisé en ce que les bactéries sont du genre *Rhodopseudomonas*, de préférence de l'espèce, *Rhodopseudomonas palustris*.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-8, caractérisé en ce que les bactéries photosynthétiques 25 produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène sont obtenues à partir de bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le 30 neurosporène, lesdites bactéries ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'insertion des gènes crtY, crtZ et/ou crtW est réalisée dans la zone des gènes au moins partiellement délétés.

5 12. Bactérie photosynthétique produisant, de manière alternative ou concomitante, au moins du lycopène, du β-carotène et de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine, caractérisée en ce que ladite bactérie est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 1 ou la  
10 revendication 9 dans son rattachement à la revendication 1.

13. Bactérie photosynthétique caractérisée en ce qu'elle est obtenue selon le procédé suivant :

- i. Mise en œuvre d'une bactérie photosynthétique synthétisant au moins un caroténoïde  
15 photosynthétique dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène,
- ii. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,  
20
- iii. Insertion des gènes suivants :
- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le β-carotène,
  - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le β-carotène,
  - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le β-carotène.

25 14. Mutant de bactérie photosynthétique caractérisé en ce qu'il est obtenu selon le procédé suivant

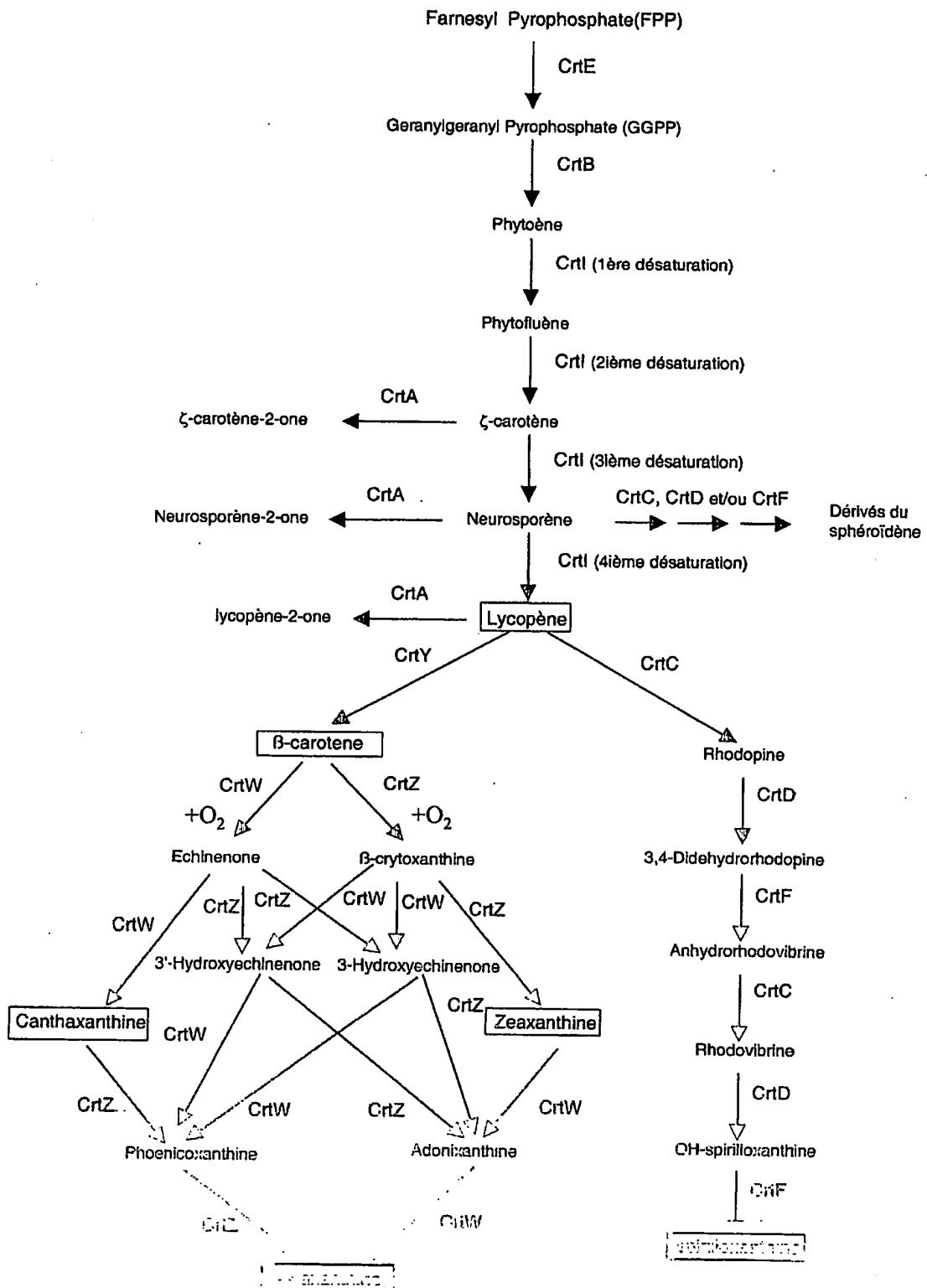
1. faire croître la bactérie dans un milieu contenant un précurseur de caroténoïde, par exemple la canthaxanthine, et faire croître la bactérie dans un autre milieu contenant un précurseur de lycopène, par exemple la β-carotène.

l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène, produisant de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine,

- 5           ii. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- 10          iii. Insertion des gènes suivants :  
              - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,  
              - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,  
15          - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène.

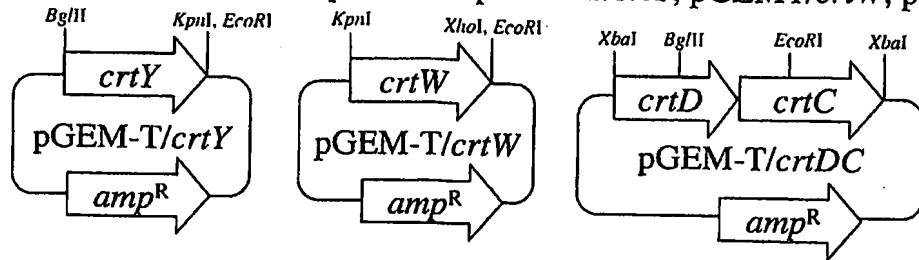
15. Bactérie selon les revendications 12 ou 13, ou mutant selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est respectivement obtenu à partir de bactérie ou de mutant produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le neurosporène, lesdits bactérie ou mutant ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

1er dépôt

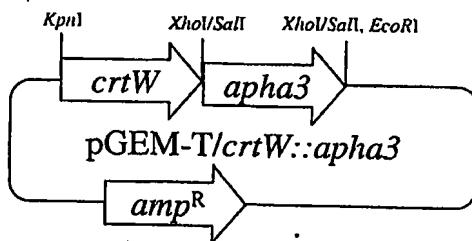


### Construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC::crtY:: crtW:: apha3

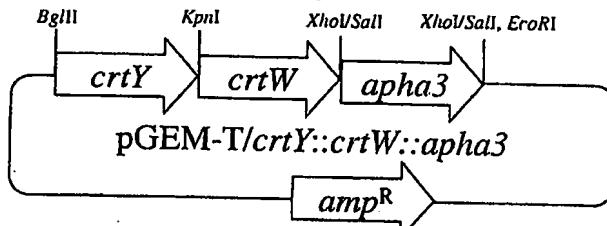
1er étape construction des plasmides pGEM-T/crtY, pGEMT/crtW, pGEMT/crtDC



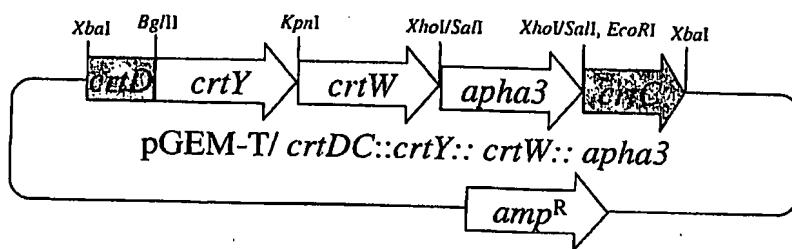
2ième étape construction du pGEM-T/ crtW:: apha3



3ième étape construction du plasmide pGEM-T/crtY:: crtW:: apha3



4ième étape construction du plasmide pGEM-T/crtDC::crtY:: crtW:: apha3



5ième étape construction du pJQ200mp18/crtDC::crtY:: crtW:: apha3

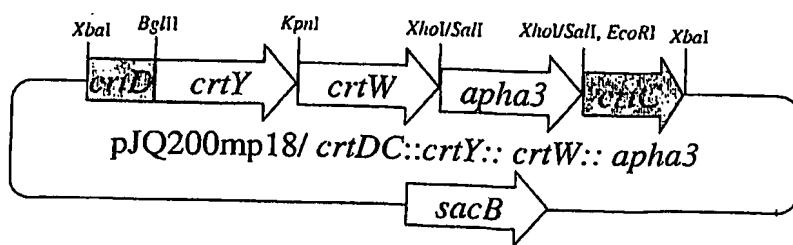
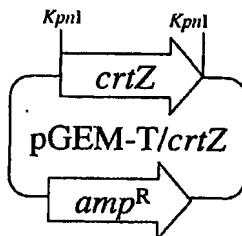


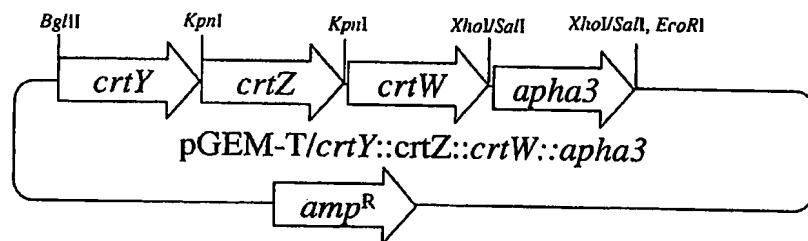
Figure 2

## Construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC::crtY:: crtZ::crtW:: apha3

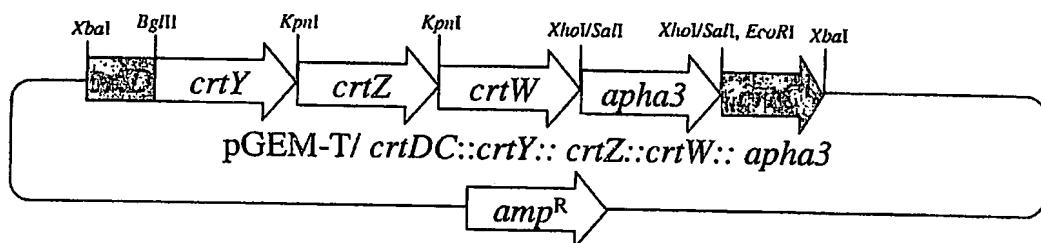
1er étape construction du plasmide pGEM-T/crtZ



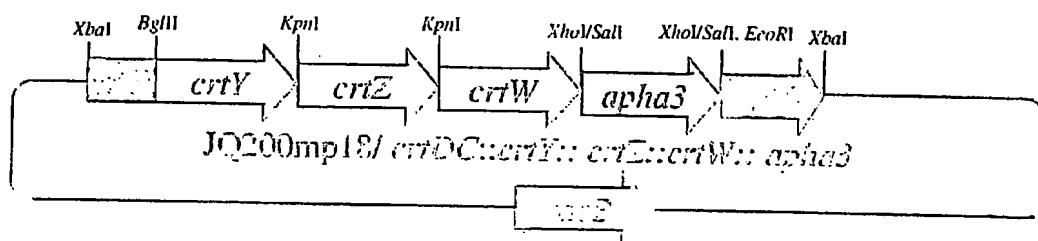
2ième étape construction du plasmide pGEM-T/ *crtY::crtZ::crtW:: apha3*



3ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtDC::crtY::crtZ::crtW:: apha3*



4ième étape construction du pJQ200mp18/*crtDC::crtY:: crtZ::crtW:: apha3*



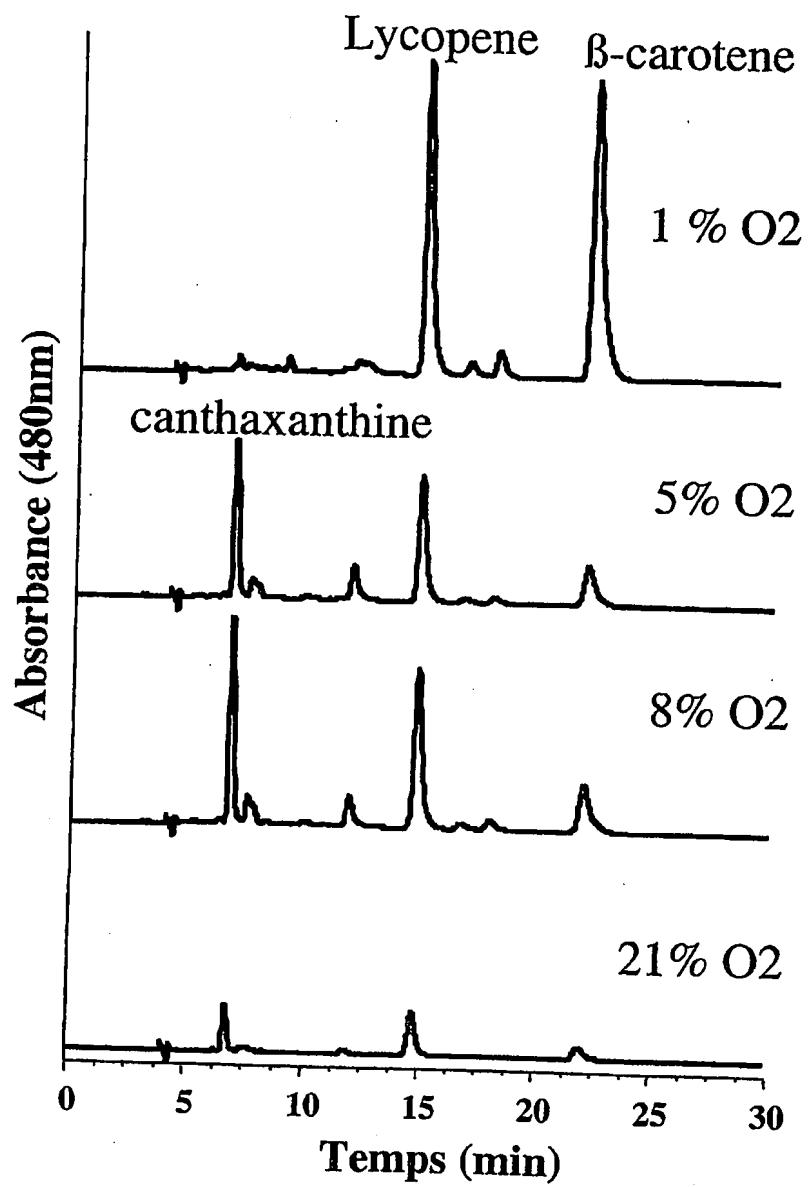


Figure 4

SEQUENCE LISTING

<110> Institut de recherche pour le développement (IRD)  
<120> Commissariat à l'énergie atomique (CEA)  
<130> Production de caroténoïdes par des bactéries photosynthétiques  
<160> 10  
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 1  
gagctcgagt tcgccggcat cggcctgaac ttctc 35

<210> 2  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 2  
ctgctcgaga ggagtattac ggactgatcg aac 33

<210> 3  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 3  
gagtcttagat tcgccggcat cggcctgaac ttctc 35

<210> 4  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 4  
ctgtctagaa ggagtattac ggactgatcg aac 33

<210> 5  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 5  
tgagatctgg aggctgttgt catgagtcga gatgccgacg tcatcg 48

<210> 7  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 7  
cggtaaccggg agctttgccca atgcatgcag caaccgccaa ggctac 46

<210> 8  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 8  
gtgaattcca tgctcgagcg ggtttagtca cgcctttcca g 41

<210> 9  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 9  
cctttggta ccggaggacc gttccatgct gttcaatctc gccatatt 48

<210> 10  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 10  
gggttacctc acgattggct gcgcctgctg cgcaattg 38



## BREVET D'INVENTION

N° 11235\*03

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

## DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 0 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	CP 61.127
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	04 00 191
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de production de caroténoïdes et bactéries mises en oeuvre	

## LE(S) DEMANDEUR(S) :

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT(I.R.D)  
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (C.E.A)

## DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

[1] Nom	FARDOUX	
Prénoms	Joël	
Adresse	Rue	Le Perou n°21
	Code postal et ville	34380 SAINT MARTIN DE LONDRES
Société d'appartenance (facultatif)		
[2] Nom	GIRAUD	
Prénoms	Eric	
Adresse	Rue	228, chemin des lorlots
	Code postal et ville	341170 CASTELNAU LE LEZ
Société d'appartenance (facultatif)		
[3] Nom	HANNIBAL	
Prénoms	Laure	
Adresse	Rue	728, rue de Fontcarrade Bât.1
	Code postal et ville	34070 MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.

## DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU COMMISSAIRE

(Il faut ajouter une signature)

INPI - 13.03.04



## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

## DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	CP 61.127
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	04 00 191
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de production de caroténoïdes et bactéries mises en oeuvre	

## LE(S) DEMANDEUR(S) :

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT(I.R.D)  
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (C.E.A)

## DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<b>1</b> Nom	VERMEGLIO	
Prénoms	André	
Adresse	Rue	390, chemin du Ventoux
	Code postal et ville	18 412 0 PERTUIS
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	_____
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	_____
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suiv/ du nombre de pages.

## DATE ET SIGNATURE(S)

## DU (DES) DEMANDEUR(S)

## OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

PEAUCELLE Chantal

N°92-1189

Paris le 9 Janvier 2004